

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO
DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CALÉNDULA (*Calendula
officinalis*) SOBRE LAS PRINCIPALES CEPAS DE
BACTERIAS CAUSANTES DE OTITIS CANINA**

DAVID GRANADOS DIESELDORFF

Médico Veterinario

GUATEMALA, MARZO DE 2015

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO
DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CALÉNDULA (*Calendula
officinalis*) SOBRE LAS PRINCIPALES CEPAS DE
BACTERIAS CAUSANTES DE OTITIS CANINA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

DAVID GRANADOS DIESELDORFF

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, MARZO DE 2015

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA

DECANO:	MSc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA:	M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I:	Lic. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II:	MSc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III:	M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Javier Augusto Castro Vásquez
VOCAL V:	Br. Andrea Analy López García

ASESORES

M.A. NATHALIA GRANADOS DIESELDORFF
M.V. VIRGINIA BOLAÑOS DE CORZO

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis*) SOBRE LAS PRINCIPALES CEPAS DE BACTERIAS CAUSANTES DE OTITIS CANINA

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título de:

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO

A SALVADOR Y MARLENE:	Por ser los más grandes ejemplos de honestidad, amor y dedicación.
A MI ESPOSA MICHA:	Por apoyarme en todo e inspirarme a dar lo mejor de mí.
A PABLO, DIEGO Y NATHALIA:	Por luchar junto a mí en todo momento y regalarme su amor incondicional.
A NICOLÁS:	Por darme el último empujón para culminar este proyecto en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por darme todo lo necesario para alcanzar esta meta y nunca haberme dejado solo, en especial en esos momentos tan dolorosos que nos toca vivir.

A MIS PADRES:

Salvador y Marlene por su incondicional apoyo, paciencia, dedicación, comprensión y amor.

A MIS HERMANOS:

Pablo, Diego y Nathalia por alentarme a siempre seguir adelante y por ser un ejemplo para mí.

A MI ESPOSA:

Melissa Elgueta por ser siempre un apoyo, por creer en mí, por creer en mis sueños, compartirlos y ayudarme a cumplirlos en especial por ser esa luz que vino a enseñarme el camino a la felicidad.

A MI HIJO:

Nicolás que ha venido a recordarme lo que es la vida y lo importante que es vivirla con simpleza, paciencia, amor y felicidad.

A MIS PRIMOS:

Krista, Coco y Gabriel por haber sido parte de mi vida como hermanos y haberme regalado tanta felicidad en mi infancia, adolescencia y actualidad.

A LA FAMILIA ELGUETA GRAMAJO:

por hacerme sentir que soy parte de ellos, por aceptarme y quererme como soy.

**A MIS ASESORES Y
EVALUADORA:**

Nathalia Granados, Virginia Bolaños y Mónica Solórzano por ser parte de este estudio, por su dedicación y apoyo.

A MIS AMIGOS:

Chema, Chino, Chamo, Mariano, Pupi, Carlos, Tucán, Diego, Fer, Javi, Pablo, Godzu, Quique, Nico, Rudy, Chicken, Armando, Canche, Choco, Abuelo, Longo, Ricky y tantos otros que me han acompañado a lo largo de mi vida y han compartido conmigo su amistad.

A MIS PROFESORES:

Chepito Roma y Juan Pablo Calderón, por ser los precursores de este reto; Yery, Freddy, Pitty, Lucky, Camey, Meoño, Valdez, Rafita y Arinzandíeta, por compartir conmigo sus conocimientos y por haberme tenido paciencia siempre.

**A LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA:**

Por tener gente maravillosa entre su personal administrativo y anexos que hacen de los años de estudios momentos inolvidables y llenos de aliento y apoyo. En especial a Doña Amandita, Doña Patty, Doña Maríita, todas las secretarias y asistentes, todos los técnicos de laboratorio, personal de granja y fincas, personal de biblioteca, a Tereso “Jerry” y Ronald “Necropsias”.

**A MI ACTUAL Y
ANTIGUOS EMPLEADORES:**

Por su apoyo y enseñanzas durante mi estancia en las empresas.

**AL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGIA DE LA
FMVZ:**

Por haber colaborado incondicionalmente en este estudio y haberme brindado carismáticamente su apoyo durante éste, ya que sin ellos no podría ser esto una realidad.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS.....	3
III. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo General.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1 Otitis externa.....	5
4.1.1 Definición.....	5
4.1.2 Etiología.....	6
4.1.2.1 Factores primarios.....	6
4.1.2.2 Factores predisponentes.....	6
4.1.2.3 Factores de persistencia.....	7
4.1.3 Tratamiento convencional.....	8
4.2.3 Estudios realizados con plantas medicinales en Guatemala aplicados a otitis externa canina.....	9
4.2 <i>Calendula officinalis</i> L.....	9
4.2.1 Descripción botánica.....	10
4.2.2 Nombres comunes.....	10
4.2.3 Hábitat.....	10
4.2.4 Usos medicinales atribuidos.....	10
4.2.5 Efectos y farmacología.....	11
4.2.5.1 Composición de las flores.....	11
4.2.5.2 Efectos de la flor.....	11
4.2.5.3 Estudios clínicos.....	13
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Área de trabajo.....	15
5.2 Recursos humanos.....	15
5.3 Recursos biológicos.....	15

5.4	Materiales y equipo.....	15
5.4.1	Materiales.....	15
5.4.2	Reactivos.....	16
5.4.3	Equipo.....	16
5.4.4	Cristalería.....	16
5.5	Metodología.....	17
5.5.1	Obtención y selección de las cepas microbianas patógenas	17
5.5.2	Selección de la planta.....	17
5.5.3	Obtención del extracto.....	18
5.5.4	Determinación de la actividad antibacteriana.....	18
5.5.5	Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	19
5.5.6	Análisis estadístico.....	20
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
6.1	Determinación de la actividad antibacteriana.....	20
6.1.1	Fase de tamizaje.....	21
6.1.2	Determinación de la CIM.....	27
VII.	CONCLUSIONES.....	26
VIII.	RECOMENDACIONES.....	27
IX.	RESUMEN.....	28
	SUMMARY.....	29
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
X.	ANEXOS.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.1.

Actividad antibacteriana de *Calendula officinalis* en la fase de Tamizaje..... 21

Cuadro No. 2.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)
de la actividad antibacteriana de la caléndula contra una cepa de
Staphylococcus intermedius..... 22

Cuadro No. 3

Hoja de toma de datos de los resultados de CIM..... 34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1

Plantilla guía para realizar estrías de siembra de cepas bacterianas
y hongos levaduriformes para la determinación de actividad antibacteriana
y antilevadura..... 33

I. INTRODUCCIÓN

La fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de las plantas medicinales y sus derivados con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para aliviar o para curar las enfermedades. Las ventajas que presenta son la facilidad con que se obtiene el material vegetal, la cantidad de propiedades medicinales presentes en una sola especie, la diversidad genética de plantas medicinales en Guatemala y el aprovechamiento de recursos naturales del país. Existe un sinnúmero de estudios del uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades. Lamentablemente, en Medicina Veterinaria es poca la información con la que se cuenta, a diferencia de la Medicina Humana. Por ello es necesario aumentar la base de datos de usos medicinales de las plantas en animales.

La otitis es la inflamación del epitelio de revestimiento del conducto auditivo, representa hasta una cuarta parte de las consultas dermatológicas caninas. Es una patología originada por factores desencadenantes y mantenida por factores perpetuantes. A su vez, se han descrito todo un conjunto de factores predisponentes que proporcionan las condiciones necesarias para la proliferación bacteriana y el crecimiento de hongos levaduriformes. Esta patología se presenta frecuentemente en las clínicas veterinarias y su tratamiento es poco efectivo y de costo económico elevado. Muchas veces los agentes etiológicos son resistentes a la terapia recomendada por el Médico Veterinario. Por lo tanto, es de suma importancia realizar investigaciones para encontrar tratamientos alternativos eficaces y de costo económico bajo. Es aquí donde la fitoterapia se convierte en una alternativa prometedora.

Se han realizado estudios que han evaluado la actividad antibacteriana del achiote (*Bixa orellana*), contra bacterias aisladas de otitis externa canina (Espino, 1997), y de seis plantas de uso medicinal sobre las principales cepas de bacterias y hongos que afectan el oído en perros (Chávez, 2010). Se obtuvo resultados

positivos así como algunos negativos. De igual forma se deben estudiar nuevas alternativas de tratamientos, probando su efectividad, y de esa forma ampliar los conocimientos sobre las plantas medicinales, sus propiedades y su uso en Medicina Veterinaria.

La caléndula (*Calendula officinalis*) es una planta nativa de Egipto, actualmente se cultiva en áreas de clima templado; en Guatemala se cultiva en el altiplano central del país. Es una planta de floración mensual y la mayoría de sus propiedades medicinales se encuentran en la flor. Se le atribuye propiedad analgésica, antihelmíntica, antiséptica, astringente, bactericida, carminativa, colagoga, depurativa, diaforética, diurética, emenagoga, estimulante, espasmolítica, estomáquica, expectorante, febrífuga, laxante, sudorífica, tónica y vulneraria. Posee una acción antiinflamatoria y cicatrizante. Experimentos *in vitro* con extractos de las flores de caléndula, muestran una actividad bactericida, antifúngica y virucida. Extractos de la flor están presentes en productos medicinales tanto en humanos como veterinarios. En estos últimos se presenta por sus propiedades de analgesia y regeneradora de epitelios, tal es el caso de toallitas húmedas para la limpieza de oídos de perros con otitis así como la prevención de esta enfermedad en animales sanos.

En este estudio se pretende comprobar de forma *in vitro*, el efecto antimicrobiano en diferentes concentraciones del extracto etanólico de Caléndula sobre las principales cepas de bacterias y hongos causantes de otitis canina y determinar si se recomienda como una alternativa terapéutica natural para esta patología.

II. HIPÓTESIS

Ho: El extracto etanólico de *Calendula officinalis* no presenta actividad antibacteriana sobre los agentes etiológicos más comunes de otitis canina.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Generar información de terapias alternativas para el control de Otitis en perros.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la efectividad *in vitro* del extracto etanólico *Calendula officinalis* sobre *Staphylococcus intermedius*.
- Determinar la efectividad *in vitro* del extracto etanólico *Calendula officinalis* sobre *Streptococcus sp.*
- Determinar la efectividad *in vitro* del extracto etanólico *Calendula officinalis* sobre *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar la efectividad *in vitro* del extracto etanólico *Calendula officinalis* sobre *Proteus mirabilis*.
- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima de la tintura de *Calendula officinalis* sobre cepas de bacterias causantes de la otitis en perros.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Otitis externa

4.1.1. Definición

El oído se compone de tres regiones anatómicas diferentes: oído externo, constituido por el pabellón de la oreja y el canal auditivo externo; oído medio, que se compone de la membrana del tímpano y de una gran cavidad timpánica que contiene los tres huesecillos de la audición, y el oído interno, en el que se encuentra el caracol y los canales semicirculares. Es costumbre asignar a cada zona una entidad nosológica independiente: otitis externa, otitis media, otitis interna. La primera es la más frecuente de las tres y las otitis media e interna son habitualmente diseminación de la afección crónica del oído externo (Bedford, 1986).

La otitis externa es una inflamación de los tejidos blandos del conducto auditivo externo. Esta puede ser un proceso patológico primario o secundario. Frecuentemente es la manifestación de una afección dermatológica generalizada. La causa de la otitis externa es multifactorial, por lo que su diagnóstico como el tratamiento es sumamente difícil (Noxon, 2002).

Las afecciones inflamatorias de los oídos se presentan frecuentemente en la clínica canina. A pesar de eso, administrar un tratamiento eficaz es muy difícil. La otorrea y las molestias son signos comunes de la enfermedad superficial de los oídos, pero la etiología de ésta es compleja, por lo que es sumamente importante realizar un diagnóstico diferencial de los factores para poder lograr la curación. El uso indiscriminado de antibióticos específicos predispone a una infestación fúngica. Un tratamiento de amplio espectro no debe remplazar dar tratamientos específicos (Bedford, 1986).

4.1.2. Etiología

En la otitis externa los factores que se hacen presentes son diversos. Como ya se mencionó antes, los agentes etiológicos se dividen en factores primarios, factores predisponentes y factores de persistencia (Noxon, 2002).

4.1.2.1. Factores primarios

Estos factores son aquellos que inician el proceso inflamatorio en el meato auditivo. Una de las causas puede ser el ácaro *Otodectes cynotis*, a pesar que éste es menos frecuente en el perro que en otros animales. La otitis puede ser prolongación de una enfermedad o estado alérgico de la piel, así como alergias por alimentos, atopia y alergias por contacto. La irritación del tegumento por cuerpos extraños es una causa importante de otitis externa, por ejemplo briznas de hierba, agua, jabón. La seborrea es otra de las causas que podemos mencionar, y menos frecuentemente, la causa puede ser traumatismos, enfermedades autoinmunitarias, adenitis sebácea y dermatosis que responde al zinc. Los factores primarios pueden ser la causa de una enfermedad externa al oído, así como la otitis puede ser una extensión de un trastorno del pabellón auricular, de otitis media o de otitis interna (Bedford, 1986; Noxon, 2002).

4.1.2.2. Factores predisponentes

Estos son los que facilitan la inflamación a través de crear un ambiente que permite la supervivencia de factores de persistencia. Podemos encontrar problemas debidos a la propia estructura anatómica del oído, como un conducto alargado con un componente vertical profundo, también debido a que el tegumento que reviste el conducto segrega continuamente la cera del oído, y el acumulo de ésta provoca la inflamación tegumentaria. Otros factores predisponentes son la humedad del conducto y la presencia excesiva de pelo en

las orejas, como los Caniches y los Terrier. Aquí mismo podemos mencionar características propias de la raza, por ejemplo el tipo de oreja caída del Cocker Spaniel que impide la adecuada ventilación del canal, o el caso del Shar Pei Chino que presenta conductos auditivos demasiado estrechos. Debemos mencionar también en esta lista todos aquellos síndromes de inmunodeficiencia, desequilibrios endocrinos, traumatismo auricular yatrógeno (por ejemplo la eliminación de pelos o limpieza con hisopos de algodón) y enfermedades obstructivas que causen drenaje y ventilación inadecuados, causados por crecimientos tumorales, pólipos inflamatorios y adenomas de las glándulas tubulares, tumores de células cebadas y carcinomas de células escamosas (Bedford, 1986; Noxon, 2002).

4.1.2.3. Factores de persistencia

Son los factores que sostienen y agravan el proceso de inflamación ocluyendo el conducto, lo que no permite que se seque o que apliquemos de forma correcta los medicamentos. Otra forma de actuar es que secretan elementos irritantes, alteran el pH del conducto y forman focos de infección, el mejor ejemplo de esto es una otitis media. Podemos encontrar que bacterias y hongos presentes en las otitis externas sean la causa inicial de las mismas, pero como estos gérmenes son comensales en el oído, se considera que es más frecuente que sean agentes secundarios. Los estafilococos son las bacterias más frecuentes en el oído normal como en el enfermo. Estreptococos, estafilococos y *Corynebacterium spp.* están presentes en los procesos patológicos. Las bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *Proteus mirabilis* ejercen su efecto patógeno como contaminantes secundarios. La *Pityrosporum canis* o también llamada *Malassezia pachydermatis* es la levadura más frecuente. Se aísla comúnmente asociada con estafilococos, aunque se puede aislar sola. Debemos mencionar que tratamientos prolongados de antibióticos son contribuyentes a su presencia. La medicación puede actuar también como factor

de persistencia (o factor primario) de la otitis externa al causar una irritación secundaria por contacto o alergia (p. ej. la neomicina y anestésicos tópicos) o dejando residuos en el conducto como preparados oleosos (Bedford, 1986; Noxon, 2002).

4.1.3. Tratamiento convencional

El tratamiento inicial de la otitis externa debe ser dirigido a controlar el proceso inflamatorio activo. Cuando los factores de persistencia ya estén controlados, el tratamiento debe estar destinado a eliminar los factores predisponentes y los procesos patológicos subyacentes primarios. Para que un tratamiento sea satisfactorio a largo tiempo y que la enfermedad no presente recurrencia, se debe identificar y tratar los factores de persistencia, los predisponentes y los primarios (Noxon, 2002).

La complejidad de la etiología puede hacer difícil la aplicación de una terapia específica. Un diagnóstico incompleto y un tratamiento inadecuado tienen como consecuencia el paso de la afección aguda a un estado crónico (Bedford, 1986).

Según el cuadro clínico se tendrán que emplear tratamientos que sean ceruminolíticos, queratolíticos, antifúngicos, antibacterianos, antiinflamatorios, antiparasitarios, anestésicos tópicos. Casi todos los preparados óticos comerciales poseen varios componentes terapéuticos, por lo que se debe seleccionar con mucho cuidado el que se vaya a emplear. El medio de administración se debe también de tomar en cuenta. Podemos encontrar productos en forma de lociones, soluciones, oleosos, cremas, pastas y polvos (Noxon, 2002).

Los antimicóticos tópicos utilizados incluyen nistatina, tiabendazol, miconazol, clotrimazol y cuprimixina. Los antibacterianos tópicos utilizados son aminoglucósidos, cloranfenicol, clorhexidina, yodóforos, propilenglicol, sulfadiacina

con plata 1%, TRIS-EDTA, colistina, polimixina B, penicilina G, bacitracina, sulfacetamida y azufre (Chávez, 2010).

El tratamiento antimicrobiano sistémico está indicado en animales con otitis externa bacteriana cuando está perforada la membrana del tímpano, está ulcerado el epitelio del conducto o las células inflamatorias contienen bacterias, lo que debe diagnosticarse en el examen citológico. El tratamiento fungicida sistémico está recomendado raramente y sólo en casos con infecciones recurrentes por levaduras o en animales con otitis externa causada por un agente micótico sistémico, como *Cryptococcus* spp. (Noxon, 2002).

4.1.4. Estudios realizados con plantas medicinales en Guatemala aplicados a otitis externa canina

Espino (1997) realizó el estudio denominado “Actividad Antibacteriana de los Extractos Etanólicos de las Hojas de *Bixa Orellana* (Achiote) en Aislados de Otitis Externas en Caninos de la Ciudad de Guatemala”. Los extractos a las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 4 g/ml fueron efectivos contra *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Chávez (2010) realizó el estudio denominado “Actividad antimicrobiana *in vitro* de seis plantas de uso medicinal sobre las principales cepas de bacterias y hongos que afectan piel y oído en perros. Se confirmó la actividad antimicrobiana de todos los extractos de las plantas, con excepción de *S. americanum* contra bacterias, y de *A. guatemalensis* y *S. domingensis* contra hongos dermatofitos y levadura.

4.2. *Calendula officinalis* L.

Familia Asteraceae

4.2.1. Descripción botánica

Hierba anual aromática, tallo ramoso, rara vez erecto, angulado, peludo, 30-60 cm de alto. Hojas inferiores espatuladas, superiores más lanceoladas o elípticas, 5-15 cm de largo, alternas, pilosas en ambas superficies márgenes dentados. Capítulo grande, 3-5 cm de diámetro, flores centrales tubulares, rodeadas de varias filas de lígulas. Flores amarillo pálido o anaranjado, en filas simples o dobles. Fruto en aquenio curvo cubierto de asperezas pronunciadas (Cáceres, 2000).

4.2.2. Nombres comunes

Botón de oro, Flor de muerto, Maravilla, Caléndula, Marigold (Cáceres, 2000).

4.2.3. Hábitat

Esta planta ha sido cultivada en Europa, desde el siglo XII, en la región mediterránea. Habitualmente la encontramos en jardines de clima templado de todo el mundo. En Guatemala podemos encontrarla cultivada en el altiplano central del país (Cáceres, 2000).

4.2.4. Usos medicinales atribuidos

Se puede utilizar la infusión o decocción de la planta, tanto flores como hojas, como un remedio oral para afecciones gastrointestinales como la gastritis, la indigestión o la inapetencia. Así mismo, la infusión se suele utilizar para enfermedades respiratorias (catarro, gripe, influenza, tos). También se puede aplicar de forma tópica la decocción en casos de golpes, contusiones, exantema, heridas, llagas, quemaduras y úlceras (Cáceres, 2000).

Se le atribuye propiedades analgésica, antihelmíntica, antiséptica, astringente, bactericida, carminativa, colagoga, depurativa, diaforética, diurética, emenagoga, estimulante, espasmolítica, estomáquica, expectorante, febrífuga, laxante, sudorífica, tónica y vulneraria (Cáceres, 2000).

4.2.5. Efectos y farmacología

4.2.5.1. Composición de las flores

- Saponinas triterpénicas (2 al 10%): glicósidos A-F.
- Alcoholes triterpénicos: monooles triterpénicos (0.8%), dioles triterpénicos (4%) y trioles triterpénicos, incluyendo lupeol, taraxasterol, psi-taraxasterol, faradiol, arnidiol, sus mono y diésteres (ácido acético, laurico, mirístico y palmitres).
- Flavonoides (0.3 al 0.8%): incluyendo isorhamnetina y quercitina.
- Hidroxicumarinas: incluyendo scopoletina, umbelliferona, esculetina.
- Carotenoides: luteína y zeaxarina.
- Aceites volátiles (0.2%): alfa-cadinol, T-cadinol y ácidos grasos.
- Polisacáridos hidrosolubles (15%): rhamnoarabinogalactonas y arabinogalactonas.

(PDR for Herbal Medicines, 2008)

4.2.5.2. Efectos de la flor

Gracias a estudios realizados *in vitro* y en animales se ha logrado encontrar muchos efectos positivos de la flor de *Calendula officinalis*. Entre estos hay efectos antimicrobianos, antiinflamatorios, antivirales y antilipídicos. La propiedad antimicrobiana se debe a los alcaloides terpenicos, lactonas y flavonas que se encuentran en el aceite esencial. Los flavonoides de la flor han tenido una actividad antimicrobiana positiva contra *Staphylococcus aureus*. En otros estudios

se ha demostrado que las flavonas son efectivas contra *Klebsiella pneumoniae*, *Sarcina lutea* y *Candida monosa* (PDR for Herbal Medicines, 2008).

Se ha demostrado que el extracto de las flores que es rico en flavonoides posee un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*. Así mismo se ha observado un efecto tricomonocida (Cáceres, 2000).

Efectos antihipotensivos: la infusión de las hojas, tallos y flores es usada para tratar la hipotensión en la medicina folclórica rusa y ucraniana. No se han encontrado estudios que traten sobre un posible potencial vasoconstrictor de la planta (PDR, 2008).

Efectos antiinflamatorios: se ha probado que el monoéster de faradiol es el antiinflamatorio más relevante, debido a su prevalencia cuantitativa en la planta (PDR for Herbal Medicines, 2008).

Efectos antilipídicos: los saponoides presentes en la caléndula han mostrado tener propiedades antihiperlipidémicas en estudios *ex vivo*. El balance de lípidos no se vio afectado cuando se experimentó en un suero normolipidémico (PDR for Herbal Medicines, 2008).

Efectos antivirales: se demostró que los extractos orgánicos de la flor seca tiene un efecto contra la actividad del virus del VIH *in vitro* (PDR for Herbal Medicines, 2008).

Efectos gastrointestinales: se cree que la caléndula tiene propiedades espasmolíticas y coleréticas a través de su producción de bilis (PDR for Herbal Medicines, 2008).

Efectos de cicatrización: se cree que la caléndula promueve la producción de glicoproteína, nucleoproteína y el metabolismo del colágeno en las heridas.

Además, se ha visto que la granulación se ve acelerada a la hora de la aplicación de la caléndula en forma tópica en las heridas, lo que favorece a su cicatrización y sanación (PDR for Herbal Medicines, 2008).

Se ha demostrado en estudios farmacológicos que el uso de las flores de forma tópica tiene propiedades antiinflamatoria y cicatrizante. Las flores tienen efectos tranquilizantes y disminuyen la excitación refleja (Cáceres, 2000).

4.2.5.3. Estudios clínicos

Se observó que la Caléndula tiene propiedades antiinflamatorias en edemas en oreja de ratón. Los edemas fueron causados con aceite de croton (PDR, 2008).

Se realizó un estudio donde se comparó la acción de una crema de caléndula a la de la trolamina en mujeres que tenían dermatitis causada por los tratamientos de radioterapia. Se reportó que la crema de Caléndula aliviaba más a las pacientes, además, al aplicar la caléndula se redujo la incidencia de reacciones alérgicas y otras razones por las que se podía interrumpir el tratamiento. En todos los aspectos, la crema de caléndula se vio mejor calificada por las pacientes. El único problema que se registró en ese grupo fue que la aplicación de la crema era más difícil (PDR for Herbal Medicines, 2008).

Los datos que existen en la literatura sobre las propiedades de sanación de heridas son positivos. Estos datos se basan en experimentos realizados en animales y de forma *in vitro*. Aunque se ha registrado un estudio en pacientes con úlceras venosas en las piernas. En este estudio se comparó la reducción del área de la herida en un grupo de pacientes que fueron tratados con una crema con caléndula y la de un grupo que se trató de forma convencional con lienzos de solución salina. La diferencia fue significativa siendo el grupo de la caléndula quien presentó los mejores resultados (PDR for Herbal Medicines, 2008).

Estudios clínicos demuestran que el uso tópico del extracto de flores en 54 pacientes con diversas dermatitis eritematosas (psoriasis, eczemas húmedo y seco, líquen, neurodermatitis, dermatitis de contacto), mostraron un resultado excelente (39%) o bueno (44%), informando los pacientes sobre alivio de la sensación de prurito y tensión en las placas extensas de la dermatosis; en el caso de aplicación tópica a 44 pacientes con acné juvenil se observó un resultado excelente (41%) y bueno (48%) (Cáceres, 2000).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de trabajo

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), USAC.

5.2. Recursos humanos

- 01 Estudiante tesista
- 02 Asesores
- Colaboradores: técnicos y Médicos Veterinarios responsables del Laboratorio de Microbiología de la FMVZ, USAC; Licda. Isabel Gaitán, Asesor de Veterinarios Sin Fronteras.

5.3. Recursos biológicos

- Extracto etanólico de las flores desecadas de la planta *Calendula officinalis*.
- Cepas de bacterias aisladas de otitis externa canina: *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*.

5.4. Materiales y equipo

5.4.1. Materiales

- Asa de nicromo en argolla
- Cajas de Petri simples y cuadriplate

- Mechero
- Pipetas automáticas
- Plantilla para siembra
- Puntas de 200 μ L y 1000 μ L
- Regla graduada en mm
- Recipiente de acero inoxidable
- Papel filtro

5.4.2. Reactivos

- Medios de cultivo: agar Muller Hinton, caldo tripticasa soya, agar Sabouraud
- Solventes: etanol al 50%, etanol al 70%, agua desmineralizada
- Solución salina isotónica

5.4.3. Equipo

- Autoclave
- Balanza analítica
- Campanas bacteriológicas con y sin flujo laminar
- Incubadoras a 27°C y 37°C.
- Refrigeradora a 5°C

5.4.4. Cristalería

- Balón de 1000 mL
- Beakers
- Erlenmeyers
- Tubos con tapón de rosca de 15 mL
- Viales

- Frascos de vidrio ámbar

5.5. Metodología

5.5.1. Obtención y selección de las cepas microbianas patógenas

Se utilizaron aislamientos de las bacterias estudiadas en el trabajo de tesis de Chávez, 2010, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*, provenientes de muestras clínicas de perros con patología de oído, proporcionados por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, USAC.

Se seleccionaron las cepas a utilizar basado en el estudio de trabajo de tesis de Chávez, 2010, donde reporta el predominio en la incidencia de las cepas aisladas de oído, conservadas en el Laboratorio de Microbiología de la FMVZ, USAC. En ese mismo estudio, el autor recomienda que se realicen nuevas investigaciones con otras plantas para que de esa forma se tengan más alternativas para el tratamiento de la Otitis Canina que sean efectivas.

5.5.2. Selección de la planta

Se seleccionó esta planta debido a experiencias *in vivo* donde perros presentaron una mejoría considerable a la hora de la aplicación del oleato de la Caléndula como tratamiento a una otitis externa perpetuada por agentes bacterianos y levaduriformes. Además, la planta que fue sometida al estudio se encuentra sembrada por el altiplano central del país. Luego, existen estudios que prueban la actividad antimicrobiana en géneros bacterianos y fúngicos de material patológico humano. Por último, el producto se utiliza en productos comerciales, como champús, para perros, pero no buscando un efecto antimicrobiano. Así

mismo, se debe mencionar que no se han hecho estudios respecto a estas propiedades sobre cultivos de bacterias y hongos que afecten el oído del perro.

5.5.3. Obtención del extracto

Se utilizaron los capítulos florales desecados de la Caléndula. Se utilizó alcohol etílico al 50% para extraer la mayor cantidad de principios activos de la flor.

La extracción se realiza a temperatura ambiente. Se pone la flor desecada picada en pequeños pedazos en un recipiente de acero inoxidable con alcohol hasta que éste penetre y disuelva las partes solubles para su extracción. Se dejó en reposo durante dos semanas con agitación esporádica. Se separaron los capítulos de la tintura por medio de filtración, se exprimó el residuo y se recuperó el solvente en un evaporador rotatorio obteniendo el extracto (Pelle, 1998).

5.5.4. Determinación de la actividad antibacteriana

Se determinó la actividad antibacteriana por el método de dilución (Mitscher *et al.*, 1972).

Inicialmente, se sembró en caldo tripticasa soya, con la ayuda del asa de nicromo, la cepa a estudiar. La siembra se llevó a incubación durante 24 horas a 37°C. Luego, de la siembra se tomaron 50 µL y se disolvieron con 4.95 mL de solución salina isotónica, de tal forma que se preparó una dilución 1:100.

Como segundo paso fue preparar el Agar-Planta. Se prepararon tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton. Se esterilizó a 121°C durante 15 min, se dejó enfriar a 50°C. En una caja de petri simple se agregó 1.0 mL de la solución de la tintura y los 9 mL de agar Mueller Hinton. Se tapó la caja y homogenizó con

movimientos circulares. Se dejó solidificar e incubar a 37°C por 24 h, para comprobar esterilidad y para que el medio se desecara un poco.

El tercer paso consistió en inocular en las cajas con agar-Planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Se hicieron cinco repeticiones por microorganismo. Se dejó reposar durante 5-10 minutos y se incubaron a 37°C durante 24 h.

Por último, se interpretaron los resultados de la siguiente manera: Si existe un crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo, el resultado será una actividad antibacteriana negativa. Mientras que si hay una actividad positiva no habrá crecimiento homogéneo. En caso de que exista una contaminación habrá presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

Se realizó un control negativo para la actividad antibacteriana con 9 mL de agar Muller Hinton y 1 mL de etanol al 60%.

5.5.5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

De primero, se preparó el agar-planta. Para esto se prepararon tubos con 3.6, 3.8, 3.9 y 3.95 mL de agar Mueller-Hinton. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, se dejó enfriar a 50°C y se agregó la solución del extracto (concentración de 100 mg/mL) en una caja cuadriplate de la siguiente manera:

3.6 mL de agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 10.0 mg/mL

3.8 mL de agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 5.0 mg/mL

3.9 mL de agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 2.5 mg/mL

3.95 mL de agar + 0.05 mL de la solución de extracto = 1.25 mg/mL

Se dejó solidificar e incubar a 37°C por 24 horas, para comprobar esterilidad. Se guardó en refrigeración hasta el momento de usar.

De segundo, se purificó el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Muller Hinton inclinado y se incubó a 37°C por 24 horas. Luego se sembró en caldo tripticasa soya, con la ayuda del asa de nicromo, la cepa a estudiar. La siembra se llevó a incubación durante 24 horas a 37°C. Luego, de la siembra se tomaron 50 µL y se disolvieron con 4.95 mL de solución salina isotónica, de tal forma que se hizo una dilución 1:100.

Por último, se inocularon tres estrías en cada uno de los cuadrantes de la caja y se incubaron a 37°C por 24 horas en el caso de bacterias y 48 horas para la levadura.

Se tomó como actividad negativa aquellos cuadrantes donde hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo. Aquellos cuadrantes donde no hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo se tomaron como actividad positiva. Y se determinó contaminación a la presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

5.5.6. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño no probabilístico intencional o por conveniencia.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación de la actividad antibacteriana

6.1.1. Fase de tamizaje

Se determinó la actividad del extracto obtenido contra las bacterias Gram positivo *Staphylococcus intermedius* y *Streptococcus sp* y las bacterias Gram negativo *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* (cuadro 1).

Cuadro 1. Actividad antibacteriana de *Calendula officinalis* en la fase de tamizaje

	Microorganismos			
	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Extracto etanólico de <i>Calendula officinalis</i> al 20%	+	-	-	-
Testigo negativo al 20% con alcohol al 50%	-	-	-	-

Fuente: Datos experimentales

El extracto etanólico de *Calendula officinalis* presentó actividad contra la cepa de *Staphylococcus intermedius*, y no presentó actividad contra *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*.

6.1.2. Determinación de la CIM

Se realizó la CIM al extracto en estudio, solamente sobre la cepa de *Staphylococcus intermedius*, ya que fue sobre la única cepa que presentó una actividad positiva en la fase de tamizaje (cuadro 2).

Cuadro No. 2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la actividad antibacteriana de la caléndula contra una cepa de *Staphylococcus intermedius*.

	Concentración del extracto			
	1:10	1:20	1:40	1:80
Extracto etanólico de <i>Calendula officinalis</i>	+	+	+	-
Testigo negativo con etanol	-	-	-	-

Fuente: Datos experimentales

El extracto etanólico de *Calendula officinalis* fue activo contra la cepa de *Staphylococcus intermedius* hasta la concentración de 1:40.

Existen varios agentes antimicrobianos disponibles en el mercado farmacéutico. Estos se encuentran en diferentes presentaciones, tanto para uso tópico como sistémico. Sin embargo, debido a la prolongada duración del tratamiento, alto costo, toxicidad y limitada acción de las drogas clásicas, existe una necesidad de crear nuevos productos que sean efectivos y alternativos. En este aspecto, el uso de plantas medicinales se ha convertido en una solución viable a dicha problemática como lo describen múltiples estudios (Gazim, *et al.*, 2008)

La actividad antibacteriana *in vitro* de *Calendula officinalis* fue determinada por el método por dilución. Este método es seguro y muy utilizado como prueba inicial para tamizar actividad bacteriana para luego evaluar CIM y así desarrollar potenciales tratamientos con actividad antibiótica.

En la cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos para la actividad antibacteriana de la tintura de *Calendula officinalis* contra *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*. Los resultados reflejaron una actividad positiva contra *Staphylococcus intermedius* y no presentó acción contra *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*. Al revisar la literatura, ésta reporta que la propiedad antimicrobiana se debe a los alcaloides terpénicos, lactonas y flavonas que se encuentran en el aceite esencial, lo que indica que el extracto etanólico probablemente arrastró dichos compuestos ya que la tintura sí presentó acción antibacteriana contra algunas cepas evaluadas. Otros estudios revelan que los flavonoides de la flor han tenido una actividad antimicrobiana positiva contra *Staphylococcus aureus* (PDR For Herbal Medicines, 2008). Otro estudio realizado en Tehran, Irán, por Gita Eslami *et al.*, reveló que el extracto metanólico (1:128) es activo contra las bacterias Gram positivo *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus fecalis* y *Staphylococcus saprophiticus* y *Staphylococcus aureus*. Además describe que las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*,

Serratia sp. y *Pseudomonas sp.*, fueron resistentes al extracto. Dichas bacterias fueron aisladas en pacientes humanos que presentaban celulitis. Es importante hacer notar que las fracciones metanólicas de la *Calendula officinalis* han resultado activas contra algunos representantes de bacterias Gram positivo y no activas contra bacterias Gram negativo. Es de suma importancia realizar estudios que comparen la actividad basada en la naturaleza de la pared celular de estos microorganismos para poder inferir sobre el mecanismo de acción de la actividad antibacteriana de *Calendula officinalis*.

Los compuestos o metabolitos secundarios en las plantas varían de forma interespecífica así como intraespecífica ya que dentro de la misma especie puede haber variaciones considerables de metabolitos secundarios dependiendo de condiciones ambientales como lo son altura, temperatura, pH, exposición al sol, calidad del suelo, etc. Por otro lado, el solvente que se utilice para el extracto también va a influir en los metabolitos secundarios presentes en el extracto, es decir, las propiedades de solubilidad y polaridad tanto del solvente como de la naturaleza de los metabolitos, van a caracterizar el extracto. Esto permite recomendar el desarrollo de estudios que evalúen la actividad antibacteriana de la caléndula comparando diferentes extractos que incluyan el aceite esencial aislado (ya que la actividad antibacteriana se la atribuye a los terpenoides presentes en el aceite), así como la comparación también del efecto a partir de caléndula cultivada en diferentes regiones del país, con condiciones ambientales diferentes.

En la cuadro 2 de resultados, se presenta la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de las flores desecadas de *Calendula officinalis* para la bacteria *Staphylococcus intermedius*. Las CIM puestas a prueba fueron 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 siendo 1:40 la CIM encontrada. Comparando los tratamientos convencionales con la CIM encontrada, que corresponde a 2.5%, se puede concluir que la concentración mínima necesaria del extracto es una concentración

más alta a las de tratamientos convencionales. Con esto es recomendable desarrollar estudios que permitan verificar la acción y concentraciones necesarias *in vivo* para el potencial desarrollo de un fitoterapico a base de caléndula para tratar otitis canina.

Durante la realización del anteproyecto, se planteó evaluar la actividad antifúngica del extracto de caléndula, para la levadura *Malassezia pachydermatis*, sin embargo, este punto no pudo realizarse ya que no se consiguió la purificación de la cepa de dicho hongo. Cabe mencionar que hay un estudio publicado que evalúa la actividad antifúngica del aceite esencial de *Calendula officinalis* en Brasil (Gazim et al, 2008). Dicho estudio se realizó sobre cepas aisladas de control para laboratorios, así como cepas de levaduras aisladas de pacientes humanos. Cabe mencionar que los resultados obtenidos en dicho estudio, revelaron que el aceite esencial de *Calendula officinalis* fue efectivo contra todos los hongos levaduriformes puestos a prueba. Dichos hongos son los principales causantes de candidiasis humanas. Esto permite recomendar posteriores estudios sobre dicha actividad aplicada a levaduras causantes de patologías caninas ya que si esto se demuestra, el terapéutico formulado incluiría tanto una actividad antibacteriana como antifúngica, actuando así sobre bacterias que generalmente vienen asociadas a levaduras como la *Malassezia*, logrando una acción de espectro más amplio que los tratamientos convencionales.

VII. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Calendula officinalis* fue activa contra la cepa de *Staphylococcus intermedius* estudiada.
- El extracto etanólico de *Calendula officinalis* no fue activa contra las cepas de *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* puestas a prueba.
- La CIM del extracto etanólico de *Calendula officinalis* fue de 1:40 para la cepa de *Staphylococcus intermedius*.
- La CIM del extracto etanólico de *Calendula officinalis* es más alta que la de productos farmacéuticos sintéticos.
- Los controles con etanol permitieron el crecimiento de las cepas bacterianas estudiadas, lo que demuestra que no se tiene una acción antimicrobiana.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar futuros estudios que evalúen la actividad antibacteriana de *Calendula officinalis* tomando en cuenta diferentes tipos de extractos así como material vegetal proveniente de diferentes regiones.
- Comparar la acción antibacteriana de *Calendula officinalis* contra bacterias Gram positivo y Gram negativo, ya que parece haber una tendencia a actuar contra bacterias Gram positivo.
- Realizar estudios de la acción antimicótica del aceite esencial de *Calendula officinalis* contra agentes patológicos caninos ya que estudios revelan acción antimicótica en levaduras causantes de candidiasis humanas.
- Realizar estudios que evalúen la actividad antibacteriana de *Calendula officinalis* tomando en cuenta diferentes solventes.
- Realizar estudios que evalúen la actividad antibacteriana de *Calendula officinalis* *in vivo* determinando las concentraciones inhibitorias.
- Realizar tamizajes fitoquímicos de muestras de *Calendula officinalis* provenientes de diferentes regiones para determinar los compuestos antimicrobianos presentes según su procedencia.

IX. RESUMEN

En este estudio se buscó demostrar que la tintura de Caléndula (*Calendula officinalis*), tiene propiedades medicinales por lo que puede ser utilizada terapéuticamente para tratar la otitis externa canina a nivel tópico. Es de suma importancia que el médico veterinario tenga tratamientos alternativos eficaces y de costo económico bajo.

Se comprobó de forma *in vitro*, el efecto antimicrobiano en diferentes concentraciones de la tintura de Caléndula, sobre las principales cepas de bacterias, utilizando aislamientos de *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*, provenientes de muestras clínicas de perros con patología de oído.

Se determinó la actividad antibacteriana por el método de dilución, sembrando las cepas en agares preparados con el extracto etanólico de la planta y en agares con etanol como control negativo. Se determinó el tipo de actividad, negativo o positivo, por un diseño no probabilístico convencional.

Se realizó la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) sólo sobre *Staphylococcus intermedius* ya que fue la única cepa sensible al extracto estudiado. Se visualizó una efectividad de la tintura en concentraciones de 1:10, 1:20 y 1:40, mientras que hubo crecimiento en 1:80, por lo que se determinó como CIM 1:40. Las demás cepas estudiadas fueron resistentes a la tintura de caléndula.

Comparando los tratamientos convencionales con la CIM encontrada, que corresponde a 2.5%, se puede concluir que la concentración mínima necesaria del extracto es una concentración más alta a las de tratamientos convencionales. Con esto es recomendable desarrollar estudios que permitan verificar la acción y concentraciones necesarias *in vivo*, para el potencial desarrollo de un fitoterapéutico a base de caléndula para tratar otitis canina.

SUMMARY

This study sought to demonstrate that the tincture of Calendula (*Calendula officinalis*) has medicinal properties so it can be used therapeutically to treat external canine otitis in a topical level. It is important that the veterinarian has an effective and low cost treatment to alternate.

It was found in vitro, the antimicrobial effect at different concentrations of the tincture of Calendula on major strains of bacteria from clinical samples of canine otitis, as *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*.

Antibacterial activity was determined by the method of dilution by seeding the strains on prepared agars with the ethanolic extract of the plant and agars with ethanol as a negative control. The type of activity was determined, negative or positive, by a conventional non-probabilistic design.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed only on *Staphylococcus intermedius* because it was the only sensible bacteria to the extract. An effectiveness of the tincture at 1:10, 1:20 and 1:40 concentrations was visualized, while there was colonies growth in 1:80, that is why 1:40 was determined as the MIC. Other strains studied were resistant to calendula tincture.

Comparing conventional treatments with the MIC, corresponding to 2.5 %, it can be conclude that the minimum inhibitory concentration of the extract is higher than the concentration of conventional treatments. With this it is advisable to develop studies to verify concentrations *in vivo* to have a good response, for the potential development of calendula as phytotherapy to treat canine otitis.

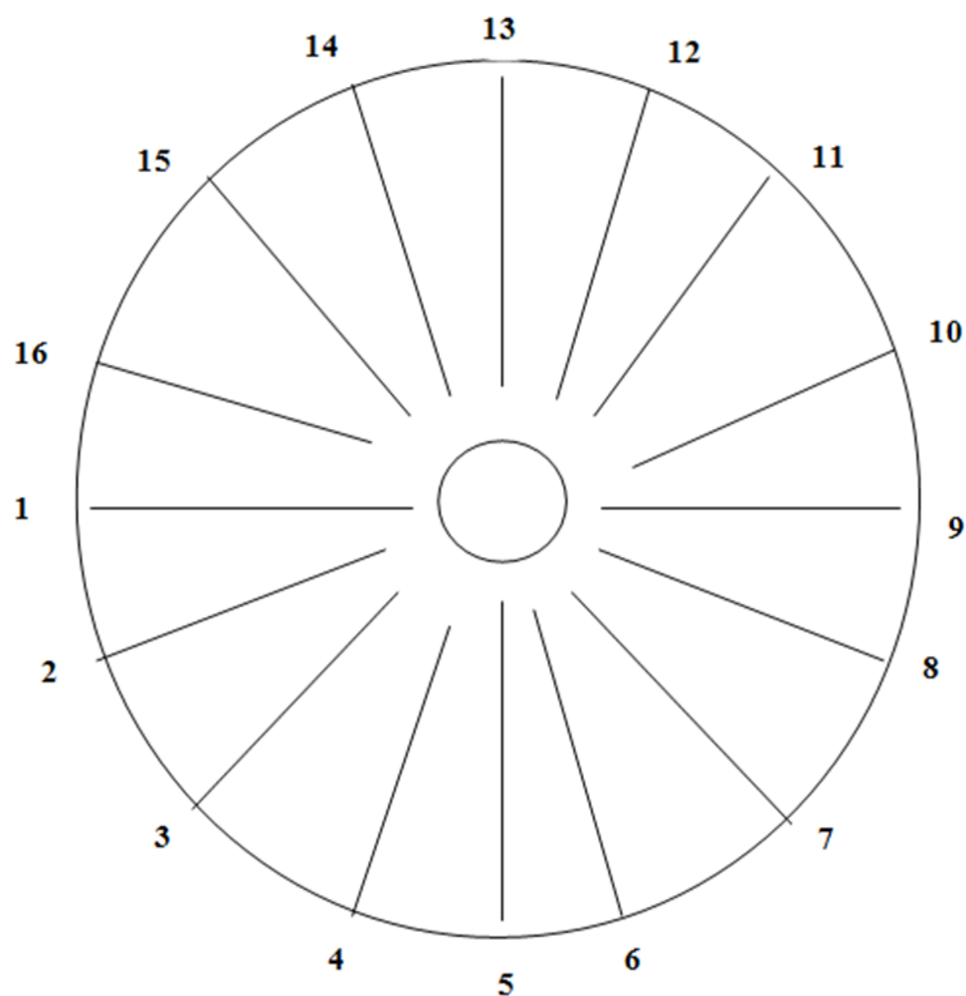
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Águila, BA; Menéndez, RO; González, CL; Fernández, DA. 2000. Extracto acuoso de *Calendula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. En: Rev Cubana Plant Med. 5(1):30-1
2. Alcázar, RO; Saz, PA. 2000. Dermatitis atópica. En: Revista Medicina Naturista. 2: 112-121
3. Arun, MI. 2010. *Calendula officinalis*: an important herb with valuable therapeutic dimensions –an overview. En: Journal of Global Pharma Technology. 2(10): 14-23
4. Bedford, PGC. 1986. Oídos, nariz, garganta y boca. En: Chandler, EA; Sutton, JB; Thompson, DJ. (ED). Medicina y terapéutica caninas. 2 ed. Trad JE Escobar. Zaragoza, ES, Acribia. p. 49-55
5. Bösch, HU; Satanassi, LU. 2007. (ED). Manuale di Fiori ed Erbe. 4 ed. Sarsina, IT, Humusedizioni. p. 62-82
6. Brendler, TH; Gruenwald, JO; Jaenicke, CH. 2007. (ED). PDR for herbal medicines. 4 ed. New Jersey, US, Thomson Healthcare Inc. p. 559-562
7. Cáceres, AR. 1999. Caléndula. (ED). Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala, GT, Editorial Universitaria. p. 108-111
8. Chávez, JU. 2010. Actividad antimicrobiana *in vitro* de seis plantas de uso medicinal sobre las principales cepas de bacterias y hongos que afectan piel y oído en perros. Tesis Lic Med Vet Guatemala, GT, USAC / FMVZ. p. 4-42
9. Eslami G, *et al.* 2011. Effects of *Calendula officinalis* extracto n bacteria isolated. 34 (4): 214-218

10. Espino, MA. 1997. Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de *Bixa Orellana* (Achiote) en aislados de otitis externas en caninos de la ciudad de Guatemala. Tesis Lic Med Vet Guatemala, GT, USAC / FMVZ. p. 2-38
11. Gazim, ZC, *et al.* 2008. Antifungal Activity Of The Essential Oil From *Calendula Officinalis* L. (Asteraceae) Growing In Brazil Brazilian Journal Of Microbiology 39:61-63
12. Lastra, Hu; Piquet, Ro. 1999. *Calendula officinalis*. En: Rev Cubana Farm. 33(3):188-94
13. Muñoz, LM. 2004. Plantas medicinales españolas *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). En: Revista Medicina Naturista. 5: 257-261
14. Noxon, JO. 2002. Otitis externa. En: Birchard, SJ; Sherding, RG. (Ed). Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies. 2 ed. Trad GEA técnicos en edición s.l. Madrid, ES, McGraw-Hill-Interamericana de España. 1:p. 495-500
15. Pelle, BR. 1998. (ED). Il manuale del fitopreparatore. 1ed. Italia, IT, Erbdomani. p. 89-96
16. Rosychuk, RA; Luttgen, P. 2002. Enfermedades del oído: Enfermedades del canal auditivo externo. En: Ettinger, SJ; Feldman, EC. (Ed). Tratado de medicina interna veterinaria. 5 ed. Trad RA Taibo. Buenos Aires, AR. Iter-médica. v.2. p. 1103-1109

XI. ANEXOS

Figura No. 1 Plantilla guía para realizar estrías de siembra de cepas bacterianas y hongos levaduriformes para la determinación de actividad antibacteriana y antilevadura.



La plantilla que fue utilizada como guía para la inoculación en el agar para la técnica de determinación de actividad antibacteriana y antilevadura, 5 estrías por microorganismos, distribuidas al azar (Ozaeta, 2008)

Cuadro No. 3 Hoja de toma de datos de los resultados de CIM

Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dirección de investigación y extensión

Seminario de Tesis I

Hoja de Resultados

Registro	Nombre de la Bacteria/ Cepa	Concentración tintura	Control positivo		Control negativo	
			Inhibición	Crecimiento	Inhibición	Crecimiento

Fuente: Elaboración propia

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE CALÉNDULA (*Calendula
officinalis*) SOBRE LAS PRINCIPALES CEPAS DE
BACTERIAS CAUSANTES DE OTITIS CANINA**

f. _____
David Granados Dieseldorff

f. _____
M.A. Nathalia Granados Dieseldorff
ASESORA PRINCIPAL

f. _____
M.V. Julia Virginia Bolaños de Corzo
ASESORA

f. _____
Dra. Mónica Estuardo Solórzano Thillet
EVALUADORA

IMPRÍMASE

f. _____
MSc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
DECANO